

Istituto di Anatomia patologica della R. Università di Siena

diretto dal Prof. O. BARBACCI

Dott. G. TAROZZI (aiuto)

ULTERIORI OSSERVAZIONI

SULLA

CULTURA AEROBICA DEI GERMI ANAEROBICI

Estratto dagli Atti della R. Accademia dei Fisiocritici

Serie IV. Vol. XVII.

SIENA

Tipografia Cooperativa

1905

Istituto di Anatomia patologica della R. Università di Siena
diretto dal Prof. O. BARBACCI

Dott. G. TAROZZI (aiuto)

ULTERIORI OSSERVAZIONI

SULLA

CULTURA AEROBICA DEI GERMI ANAEROBICI

Estratto dagli Atti della R. Accademia dei Fisiocritici
Serie IV. Vol. XVII.

SIENA
Tipografia Cooperativa

1905

Ulteriori osservazioni sulla cultura aerobica dei germi anaerobici

del dott. GIULIO TAROZZI (aiuto).

Le recenti mie osservazioni sulla possibilità di coltivare in presenza dell'aria diversi germi anaerobici, tra i quali i tre patogeni meglio noti, il bac. del tetano, il bac. del carbonchio sintomatico e il vibrione settico, se mi davano ragione a ritenere probabile che il mezzo da me proposto potesse applicarsi anche ad altre tra le specie degli anaerobici oltre a quelle sulle quali io aveva sperimentato, non mi permettevano però di potere ciò affermare per la generalità dei germi che vanno sotto questa designazione. A sincerarmi del fatto mirano essenzialmente le osservazioni seguenti, che sono state portate sopra una serie abbastanza numerosa di germi anaerobici, che sono quanti la casa Kráhl di Praga poteva mettere a mia disposizione.

Le nuove specie diverse di germi anaerobici noti che così ho potuto avere a mia disposizione e sui quali ho sperimentato il metodo della cultura aerobica sono in tutto 10 e cioè: *Bac. enteritidis sporogenes* (Klein) - *Bac. putrificus* (Bienstock) - *Bac. cadaveris sporogenes* (Klein) - *Bac. carnis* (Klein) *Paraplectrum foetidum* (Weigmann) - *Clostridium carnis foetidum* (Salus) - *Bac. d. Bradsod* (Jensen) - *Bac. carnis saprogenes* (Salus) - *Bac. fusiformis serof.* (Hellermann) - *Bac. botulinus* (van Emmergen) (1).

Nello stesso tempo ho estesa l'osservazione al modo di comportarsi di questi germi in condizioni aerobiche se coltivati in

(1) Trascrivo questi nomi di specie e di Autori esattamente dalle indicazioni che porta con sè ciascuna delle culture originali.

diversi liquidi naturali, come il sangue, il siero, il liquido ascitico e il latte, ed i risultati ottenuti riunisco in questa nota.

È bene avvertire però che io non intesi fare della biologia speciale e quindi della analisi minuta e particolareggiata su ogni singola specie, ciò che per noi avrebbe avuto poco interesse anche in considerazione che si tratta per lo più di saprofiti che hanno o nessuna affatto o dubbia attinenza colla patologia sia umana che animale, ma miravo piuttosto alla constatazione di fatti appartenenti ad un determinato ordine e di carattere comune alla intera famiglia degli anaerobii. Considerate sotto questo punto di vista le presenti ricerche sembreranno forse meno incriminabili di incompletezza.

Parimente non toccherò, se non accidentalmente e di sfuggita ove se ne presenti il caso, le questioni che riflettono la interpretazione dei fenomeni intimi della anaerobiosi, perchè esse formeranno speciale oggetto di altro lavoro non ancora interamente compiuto.

Oltre alle 10 specie di anaerobici sopra dette ho compreso nelle presenti ricerche anche i tre germi anaerobici patogeni più noti, bac. del tetano, bac. del carbonchio sintomatico e vibrione settico, in considerazione dello speciale interesse che sopra di essi richiama la parte ben definita che hanno come agenti eziologici nella Patologia. Ho invece trascurato affatto di occuparmi delle specie saprofitiche da me isolate dal cadavere e dall'intestino del cane, sia perchè di esse ho già avuto campo di dire in altro mio lavoro precedente, sia perchè la loro qualità di semplici saprofiti non giustifica in questo luogo una speciale trattazione.

Le osservazioni fatte sopra le singole specie dei sopradetti anaerobi si riferiscono:

1.º Al loro modo di comportarsi in brodo comune in presenza o in assenza di ossigeno.

2.º Al loro comportamento in brodo od in agar inclinato in presenza di un frammento di tessuto allo stato naturale.

3.º Al loro sviluppo in brodo non spogliato del coagulo albuminoso ed all'azione dispiegata su quest'ultimo dallo sviluppo del germe.

4.° Allo sviluppo nel sangue non defibrinato, nel siero e nel liquido ascitico.

5.° Al loro sviluppo nel latte.

I. CULTURE IN BRODO — Per queste culture io adoperavo sempre brodo peptone *preparato di recente e non glucosato*. Mi attenni a queste due condizioni perchè la prima di esse ha spesso una importanza molto manifesta nella riuscita delle culture dei germi anaerobici in genere e vi rende superflua l'aggiunta del glucosio. Quando poi in altro luogo noi cercheremo di interpretare per quali intime modificazioni un mezzo comune di cultura possa diventare improprio alla vita dei germi anaerobici e per quale meccanismo la presenza del glucosio possa spiegare la sua influenza favorente, verranno forse meglio intesi questi fatti.

Feci di tutti i germi nel brodo peptone culture aerobiche ed anaerobiche. Le culture aerobiche dettero costantemente risultato negativo ad eccezione che per tre delle specie prese in esame, e cioè per il *Clostridium carnis foetidum*, per il *bac. d. Bradsot* e per il *bac. carnis saprogenes*, dei quali ottenni sviluppo, per quanto non molto rigoglioso, anche in presenza dell'aria. L'esame in goccia pendente dimostrò per tutte e tre queste culture la presenza di bacilli aventi ad un dipresso la stessa forma e dimensione, leggermente mobili, ad estremi arrotondati, i quali formavano una spora collocata per lo più ad un estremo del bacillo, ma non mai però decisamente terminale. Trapianti da questi brodi sopra substrato solido inclinato rimasero sterili. Io ritenni perciò questi tre germi come appartenenti a specie anaerobiche non nel senso stretto della parola.

Le culture anaerobiche fatte nello stesso brodo riuscirono invece positive per tutti i germi, con sviluppo più o meno rigoglioso, ad eccezione che per due e cioè per il *bac. carnis* e per il *bac fusiformis serofil.* Per il primo di questi ebbi sviluppo positivo in substrati più acconci, come vedremo tra poco; per il secondo ogni prova tentata rimase sempre negativa, per cui non posso escludere che si trattasse di una cultura originale o morta o a potere vegetativo estremamente affievolito e non posso perciò tenere alcun conto dei risultati negativi con esso ottenuti.

La reazione del mezzo di cultura si mantenne per tutti i germi sempre leggermente alcalina. La produzione di indolo fu costante solo per il *bac. enteritidis*, non costante e sempre molto leggera per il bacillo del tetano: per gli altri germi non mi fu possibile rilevarla in queste culture.

Esaminate in goccia pendente per rilevare di ciascun germe i caratteri microscopici più grossolani, si notò che questi sono per molti di essi così affini che spesso non se ne può con questo solo criterio nemmeno sospettare una differenza fra l'una specie e l'altra. Anche la motilità non mi parve avere nulla di caratteristico, e dei germi descritti dai loro scopritori come eminentemente mobili, quale ad esempio il *bac. cadaveris sporogenes* di Klein, nelle nostre culture - che pure erano rigogliosissime - si mostravano ora immobili, ora dotati di movimenti leggerissimi. Non ho tenuto conto in questo esame naturalmente dei tre germi patogeni, tetano, carbonchio sintomatico e vibrione settico, perchè i loro caratteri sono a tutti ben noti. Le altre nove specie di anaerobii mi pare si possano per riguardo alla forma dividere in due gruppi. Quelli appartenenti ad un primo gruppo, del quale fanno parte il *b. putrificus*, il *b. cadaveris sporogenes*, il *paraplectrum foetidum*, il *b. d. Bradst.*, il *b. carnis saprogenes* e il *b. botulinus*, si presentano ad un dipresso coi seguenti caratteri comuni: bastoncini lunghi da 5 a 7 micron, larghi da 0,5 ad 1, ad estremi arrotondati, tutti capaci di movimenti leggeri e non costanti; tutti formano una spora più o meno decisamente ovalare, collocata ad un'estremità del bacillo, ma non sempre esattamente terminale. La spora nelle culture un po' vecchie si spoglia dei resti bacillari, restando nella cultura come un piccolo corpicciuolo ovoide libero e rifrangente.

In un altro gruppo si possono comprendere i tre rimanenti germi, i quali morfologicamente nelle mie culture si staccavano alquanto dal tipo comune sopra detto. Per il *b. enteritidis* e per il *b. carnis* (di quest'ultimo, non essendo riuscite le culture anaerobiche in brodo. L'osservazione fu fatta solo sulle culture aerobiche di cui dirò tra poco) i singoli elementi mostravano tendenza a formare delle corte catenelle di 3-4 fino a 6-7 elementi, che poi sporificando conservavano la stessa disposizione e formavano

come delle catenelle di rosario (1). La forma e le dimensioni delle spore erano però in tutti e due simili a quelle degli altri germi descritti. Il *clostridium carnis foetidum* si differenziava morfologicamente per il fatto di non essere la spora terminale, ma mediana o leggermente eccentrica, come si osserva per lo più nel bacillo del carbonchio sintomatico.

Questi pochi cenni morfologici sulle specie di germi anaerobici che avevo a mia disposizione non hanno naturalmente altro scopo che di servire ad una recognizione superficiale dei medesimi. A me poi non interessava affatto addentrarmi maggiormente nella loro esatta identificazione, compito sempre difficile, trattandosi di saprofiti.

Interessa piuttosto passare alle osservazioni fatte sullo sviluppo in culture aerobiche di questi stessi germi ed alle diverse loro manifestazioni in vari substrati culturali,

II. CULTURE AEROBICHE IN AGAR ED IN BRODO. — E' indifferente, come già più volte ho avuto occasione di far rilevare, la natura del tessuto che si aggiunge nel tubo di cultura, quando si evitino i tessuti troppo poveri di elementi parenchimali, come il tessuto connettivo fibroso, il tessuto adiposo etc. In generale io adoperavo organi parenchimali, come il fegato, perchè con questi lo sviluppo è sempre più rigoglioso. È bene che il pezzo di tessuto aggiunto nel tubo non sia troppo piccolo, se si vogliono avere culture molto abbondanti: la grossezza di 1½ cmc. in media è la più adatta.

La sterilità dei tubi di cultura così preparati veniva provata lasciandoli per due giorni nella incubatrice a 37° prima di seminarli; il materiale di innesto veniva prelevato direttamente dalle culture anaerobiche originali. È bene accertarsi con l'esame in goccia pendente se l'ansa di platino asporta dalla cultura originale dei germi e specialmente delle forme sporificate per evitare di registrare un risultato negativo ove invece non vi fu che un

(1) In trapianti ulteriori, rinvigorendosi la vitalità del germe, andò perdendosi la tendenza a formare catenelle, ed i caratteri morfologici grossolani si accostarono fino alla somiglianza completa a quelli descritti per il gruppo precedente.

difetto nella presa della cultura originale. Ciò del resto, avendo a disposizione delle culture ben sviluppate, non accade che in via assolutamente eccezionale. L'ansa di platino col materiale di innesto viene poi agitata nel brodo o nel liquido di condensazione dei tubi di agar, ove si trova il frammento di tessuto aggiunto.

I risultati avuti da queste culture si compendiano in poche parole, essendo stati ad un dipresso uguali per tutti i germi esaminati. Si ebbe cioè per tutti e costantemente sviluppo aerobico rigoglioso. Nel brodo si produce intenso intorbidamento già dopo 24 ore di termostato e sull'orlo del liquido si formano in generale delle bolle per produzione di gaz. Dopo 4-5 giorni in generale il liquido di cultura si fa limpido negli strati superiori e si forma un ricco sedimento di bacilli, di spore e di detriti cellulari; il tessuto aggiunto si rammollisce, si disgrega se appartenente ad un organo molto ricco di cellule parenchimatose, come il fegato, e può ridursi interamente ad una massa poltigliosa, grigiastra, di carattere putrido. L'azione dissolvente sul tessuto può variare d'intensità anche in culture fatte con lo stesso germe senza che se ne possa precisare la ragione.

Il liquido di cultura assume in generale un colorito scuro-sporco fino a poter divenire tutta la massa di un aspetto nero che ricorda quello dei cadaveri in avanzata putrefazione. Sembra che alla produzione di questo colore influisca specialmente l'azione dell'ossigeno atmosferico sulle sostanze pigmentali dei muscoli e del sangue modificate dall'azione putrefattiva, poichè esso non si manifesta nelle culture fatte con tessuti bianchi e privi di sangue, quali la sostanza cerebrale e le ghiandole linfatiche, come pure nelle culture chiuse anaerobicamente, nelle quali tanto il tessuto, come il liquido eccipiente conservano inalterato il colorito rosso del pigmento sanguigno. Appena una di queste culture venga aperta e lasciata al contatto dell'aria, in poco tempo si scurisce fino a poter diventare in trasparenza di aspetto affatto nero.

Le culture di tutti i germi esaminati emanano indistintamente uno spiccato odore di putrefazione che non mi parve caratteristico per nessuna delle singole specie. Inoltre mi parve notare che sia l'intensità che il carattere dell'odore emanato dalle cul-

ture possa essere sensibilmente influenzato dalla natura del tessuto aggiunto.

Sul' agar, parimente già dopo 24 ore di stufa, si sono formate numerose bolle di gaz sul liquido di condensazione: spesso si producono fessure nell' agar stesso. Per il *bac carnis* di Klein la produzione di gaz mi sembrò costantemente meno abbondante che per gli altri germi. Il tessuto aggiunto all' agar vi subisce le stesse modificazioni di carattere putrido che si sono viste per le culture in brodo. Lo sviluppo delle culture è in generale limitato al liquido di condensazione e sulle parti del frammento di tessuto che emergono da esso; sulla superficie dell' agar si forma in vicinanza del liquido di condensazione uno straterello grigiastro, una specie di pellicola, costituita di bacilli, di spore e di detriti cellulari. Sulle parti più alte del piano inclinato dell' agar in generale non si ha sviluppo o questo si arresta alle forme vegetative senza che queste possano arrivare ad una completa sporificazione. E' tuttavia notevole come lo sviluppo della cultura avvenga in generale nei tubi di agar più rigoglioso e più denso che nel brodo, ove il contatto coll' ossigeno atmosferico è sempre meno immediato. Per questa considerazione e per il fatto ancora che, come vedremo tra poco, il germe si sviluppa anche bene sopra un frammento di tessuto sterile collocato in un tubo privo di brodo, e di agar, non credo si possa parlare di una semplice azione disossidante o riducente spiegata dal tessuto aggiunto sul mezzo nutritivo. A questo solo scopo dovrebbe allora prestarsi assai meglio l' aggiunta al substrato di una piccola quantità di glucosio: si può sempre osservare difatti che se in una provetta contenente brodo glucosato si aggiunge una goccia di bleu di metile e si toglie dal contatto coll' ossigeno atmosferico, il liquido nel periodo di 1 a 3 giorni si scolora, perchè il bleu si riduce; ma se in un altro tubo di brodo semplice si aggiunge un frammento di tessuto e si allontana del pari l' ossigeno atmosferico, la riduzione può anche avvenire più tardivamente e incompletamente. Se dall' altro canto invece di chiudere le provette dopo avervi sottratto l' ossigeno, si lasciano al contatto dell' aria semplicemente tappate col cotone, si osserva che il bleu di metile non si scolora affatto, e ciò verisimilmente perchè nel liquido

si diffonde continuamente l'ossigeno atmosferico. Eppure in un tubo di brodo glucosato comune il germe anaerobico non si sviluppa in presenza dell'aria, mentre vi si sviluppa rapidamente se si aggiunge alla cultura un pezzetto di tessuto fresco! Si noti ancora che agendo convenientemente si può ottenere che i germi si sviluppino iudubbiamente anche sulla superficie libera dell'agar, quantunque tale sviluppo sia sempre assai meno rigoglioso che nel liquido di condensazione o sopra il tessuto aggiunto. Ma su queste questioni dovrò ritornare presto e più a lungo in altro lavoro, per cui non è il caso di approfondirle più oltre.

Ho ricercato l'indòlo anche in queste culture aeròbiche ed ebbi gli stessi risultati ottenuti dalle culture anaerobiche in brodo comune, e cioè si mostrò la sua presenza costante solo per il *bac. enteritidis* e per il *bac. carnis*: incostante e sempre debolissima per il bacillo del tetano.

Che il tessuto aggiunto alla cultura non eserciti solo un'azione favorente dello sviluppo aerobico dei germi anaerobici, ma costituisca per sè stesso un substrato adatto e sufficiente alla loro vita si può desumere dal fatto che si può sostituire al brodo dell'acqua semplice o meglio della soluzione fisiologica di cloruro di sodio ed ottenere sviluppo rigoglioso per tutti i germi indistintamente. Nello stesso modo è sempre manifesto lo sviluppo più o meno rigoglioso, già in meno di 24 ore di termostato, sulla superficie di pezzi di tessuto semplicemente depositati nel fondo della provetta con solo qualche goccia di acqua che li protegga da un troppo rapido essiccamento. In queste condizioni oltre ai germi saprofiti banali svilupparono ora più ora meno rigogliosamente, ma costantemente, anche i tre germi patogeni, bacillo del tetano, bacillo del carbonchio sintomatico e vibrione settico.

Riassumendo, da questa prima serie di osservazioni vediamo come sia proprietà comune a tutti i germi anaerobici presi in esame lo svilupparsi prontamente e rigogliosamente in presenza dell'ossigeno, quante volte si aggiunga al mezzo di cultura del tessuto organico allo stato naturale, l'azione putrifica e dissolvente su detti tessuti e la produzione del gaz: nessun carattere si manifestò invece con nota speciale per un determinato germe.

Anche le tre specie che abbiamo visto essere capaci di vita aerobica nel brodo comune e come tali da non potersi ritenere come strettamente anaerobiche (*Clostridium carnis foetidum*, *Bac. d. Bradsoi* e *Bac. carnis saprogenes*) si mostrarono tuttavia molto sensibili alla presenza del tessuto nel mezzo di cultura, perchè svilupparono in queste condizioni molto più rapidamente e copiosamente.

III. SVILUPPO IN BRODO DI RECENTE PREPARATO E NON SPOGLIATO DEL COAGULO ALBUMINOSO. — Per queste, come per tutte le ricerche seguenti, io mi valsei per i trapianti non più delle culture anaerobiche originali, ma di culture aerobiche ottenute nel modo anzidetto. Il procedimento tenuto per preparare questo substrato era quello che già ho esposto in altro precedente mio lavoro. La precipitazione dell'albumina e la sterilizzazione doveva farsi ad una temperatura dell'autoclave alquanto inferiore a quella di una atmosfera, poichè ad una temperatura maggiore non è più possibile lo sviluppo aerobico dei germi. Ottenni in queste condizioni per tutti i germi uno sviluppo aerobico rigoglioso; gli innesti praticati in tubi contenenti lo stesso brodo, ma filtrato, rimasero sempre sterili, ad eccezione che per le tre specie già ricordate le quali non si erano dimostrate come strettamente anaerobiche. Parimente sterili rimanevano le culture se i tubi col precipitato si lasciavano diversi giorni in contatto dell'aria prima di seminarli.

Il precipitato, sviluppandosi la cultura, assume dapprima un colorito rossastro più o meno intenso, e comincia a dissolversi in modo che dopo 3-4 giorni di incubazione non ne rimangono che pochi resti in fondo alla provetta. Lo sviluppo del germe è in generale rigogliosissimo. Tale modo di comportarsi in queste culture fu comune a tutti i germi ad eccezione di due, il *bacillo* del tetano e il *bac carnis*; per questi non vidi mai disciogliersi il precipitato; esso si modifica solo nel senso che riacquista sotto l'influenza dello sviluppo della cultura, un bel colorito roseo. È da notarsi però che l'intensità di sviluppo per i due germi in questo substrato non è mai così grande come per gli altri, i quali spiegano azione dissolvente sul precipitato. Io però rimango du-

bitoso a considerare come caratteristiche queste diverse proprietà, poichè per altre specie di saprofiti isolati dal cadavere e dall'intestino del cane, e che pure non ho sufficienti ragioni per ritenere specie diverse da quelle trovate in queste stesse condizioni da altri Autori (*Klein, Bienstock* etc.) il precipitato albuminoso non veniva disciolto, ma solamente modificato nel colore. Non si può escludere difatti che la proprietà di produrre sostanze dissolventi per le albumine precipitate possa, al pari di tutte le altre manifestazioni biologiche dei batteri, essere soggette a modificazioni estesissime di grado e d'intensità. Il fatto sembra però costante per il bacillo del tetano, poichè di questo avevo a mia disposizione tre culture originali di diversa provenienza ed il risultato fu sempre uguale. Anche agevolando lo sviluppo della cultura colla sottrazione dell'ossigeno, l'azione sul precipitato non veniva per questo modificata.

Non credo a questo punto superfluo interessarmi brevemente della natura delle modificazioni che inducono questo mutamento di colore nel precipitato.

Mi pare ovvio il ritenere anzitutto che sia la sostanza colorante del muscolo quella che si modifica precipitando col calore e che poi si ripristina, almeno per ciò che riguarda il colore, sotto l'azione dello sviluppo del germe. La sostanza colorante del sangue si comporta a questo riguardo nello stesso modo.

Facciamo intanto qualche osservazione sui particolari di questo fenomeno.

Se in un tubo di brodo contenente del precipitato albuminoso che sia colorito in roseo per lo sviluppo del bacillo del tetano (questo germe si presta meglio degli altri perchè, come si è visto, ne modifica solo il colore senza indurne la dissoluzione) si espone per brevissimo tempo all'ebullizione a bagno-maria, il colorito rosso prestamente scompare. Nello stesso modo se uno di questi tubi rimane esposto all'aria e meglio se contemporaneamente vi agisce anche la luce, il colorito roseo gradatamente scompare, cominciando la decolorazione dagli strati superficiali e progredendo a grado e lentamente fino al fondo del tubo di cultura; per cui la luce non agirebbe che agevolando l'azione del contatto dell'aria sul precipitato, azione che con tutta probabilità

deve consistere in fatti di ossidazione. Del resto si sa che nelle culture dei germi anaerobici si producono fenomeni di riduzione; ma nel caso nostro, trattandosi di culture aerobiche di questi stessi germi, può sorgere giustificato il dubbio che la funzione riduttrice di cui essi si mostrano capaci abbia per solo fine quello di provvedere l'ossigeno necessario alla loro vita, sottraendolo alle sostanze contenute nel substrato, od abbia piuttosto quello indiretto di rendere utilizzabile per la loro assimilazione le sostanze ossidate contenute nel substrato stesso. Mi pare che la prima ipotesi manchi di fondamento nei casi in cui la vita del germe si svolge in presenza dell'aria: più plausibile invece appare la seconda; ma essa richiede tuttavia di essere convalidata da qualche fatto dimostrativo, ciò che non è qui il luogo di fare. Ricorderò solo, per la interpretazione della natura delle intime modificazioni per cui la sostanza colorante muscolare precipitata e scolorita dal calore riacquista il suo colore normale, come sia sempre possibile riprodurre il fenomeno agendo sopra il precipitato albuminoso del brodo con dei mezzi che indubbiamente devono esercitare una azione riducente sul precipitato stesso. Basta infatti a tale scopo aggiungere ad uno di questi tubi reso alcalino con l'aggiunta di poche gocce di carbonato sodico, una piccola quantità di glucosio e riscaldarlo a bagno-maria, perchè si veda il precipitato mutare il suo colore di foglia morta in un bel colorito roseo più o meno intenso. Questa colorazione però anche in questo caso, come si è visto, per quello che si verifica sotto la azione del germe, si manifesta più intensamente se il brodo è preparato di recente; se il brodo è vecchio, anche già solo di uno o due mesi, il fenomeno non si avvera più. Inoltre il contatto dell'aria, anche in questo caso, scolara di nuovo in breve tempo il precipitato; si sa invece quanto resista il colore muscolare allo stato naturale. Per cui mi pare si possa ritenere per fermo che la restituzione del colore rosso alla sostanza colorante muscolare sia da attribuirsi a fenomeni di riduzione che si esercitano su questa sostanza medesima, e mi pare pure risultare con sufficiente chiarezza da quanto sopra è esposto che questa stessa sostanza subisce per effetto del calore una modificazione stabile, verso la quale essa tende a ricondursi quante volte ne sia stata momentaneamente

distolta per l'azione di sostanze riducenti sia di natura batterica che chimica.

IV. SVILUPPO NEL SANGUE, NEL SIERO E NEL LIQUIDO ASCITICO — Ho già altra volta fatto rilevare, a proposito di altri germi anaerobici, come in generale i liquidi naturali dell'organismo si prestassero poco o nulla affatto allo sviluppo aerobico dei medesimi. Questa constatazione poteva giustamente presentarsi come un contrasto poco comprensibile di fronte all'azione così sorprendentemente favorevole spiegata dalla semplice presenza di un frammento di un tessuto qualsiasi, e degna perciò di fermare in modo tutto speciale la nostra attenzione. Io non mi nascondo però che il penetrare nell'intima ragione di questo fenomeno si presenta come un compito oltremodo difficile e delicato, implicando esso la conoscenza esatta dello stato chimico delle sostanze costituenti le cellule dei tessuti da una parte ed il siero e gli elementi figurati del sangue, specialmente degli eritrociti, dall'altra nel loro stato naturale, conoscenza che noi siamo ben lungi dal possedere e dalla quale ci separa per ora in modo insormontabile la necessità di usare nello studio analitico e qualitativo di esse di mezzi i quali indubbiamente turbano se non alterano anche profondamente, senza che se ne possa valutare il modo e la misura, il loro primitivo modo di essere, che a noi appunto più interesserebbe di conoscere. Di proposito quindi mi limito anche qui ad esporre semplicemente il risultato della osservazione. Siccome poi in queste osservazioni noi ci troviamo in presenza di liquidi provenienti direttamente dall'organismo animale, i quali potrebbero quindi o già solo per una diversa origine o per contingenze speciali dell'organismo da cui sono prelevate, agire in modo diverso sulla vitalità e sullo sviluppo dei germi nel loro seno, così credo opportuno, per evitare il pericolo di generalizzazioni premature, di specificare, oltrechè la natura, anche l'origine del liquido adoperato per le culture.

Per quel che riguarda le ricerche sul sangue, adoperai a tale scopo sangue fresco di coniglio, raccolto asetticamente con una cannula da salasso dalla carotide. Per questo genere speciale di osservazioni parendomi superfluo provare tutta la serie dei germi

anaerobici di cui disponevo, mi sono limitato ai tre soliti germi patogeni ed alle seguenti specie di saprofiti: *bac. putrificus*, *clostridium foetidum* e *bac. carnis saprogenes*.

Lo sviluppo riuscì sempre negativo per il bacillo del tetano: una sola volta vidi prodursi pochi bacilli e dopo diversi giorni notai anche la presenza di qualche forma sporigena caratteristica in un tubo nel quale, insieme col sangue, era caduto un grosso coagulo fibrinoso. Non credo però che questo risultato positivo possa attribuirsi solo alla presenza della fibrina, poichè questa si trovava pure in tutti gli altri tubi in cui era raccolto del sangue come spillava dalla arteria, ma ritengo più probabile sia da attribuirsi alla maggior ricchezza del sangue contenuto nel tubo di qualche altro elemento che il coagulo fibrinoso aveva trattenuto con sè nel formarsi in fondo al matraccio, e probabilmente di leucociti.

Per gli altri germi ottenni approssimativamente lo stesso risultato, e cioè mentre nei primi due o tre giorni pareva non si notasse alcun sviluppo, questo si ebbe, per quanto però molto scarso e lento, nei giorni susseguenti. Verso il 10° giorno erano visibili in tutte le culture delle forme sporigine poco numerose, ma completamente evolute.

Non mi pare poi che la ragione di questo così scarso sviluppo debba ricercarsi semplicemente in un eventuale potere ostacolante o battericida del sangue per due motivi: anzitutto queste condizioni non mutano se il sangue si riscalda preventivamente per 10-15 minuti a 50°-55° C.: in secondo luogo poi, se in uno di questi tubi contenenti il sangue appena raccolto si aggiunge, al momento dell'innesto del germe, un pezzetto di fegato o di altro organo qualsiasi, si ottiene facilmente un pronto e rigoglioso sviluppo del germe stesso. Come ho detto, non posso entrare nell'analisi di eventuali differenze nello stato chimico delle sostanze componenti il sangue e di quelle componenti le cellule dei tessuti, per potermi spiegare questo diverso comportamento rispetto allo sviluppo dei germi anaerobici. Ho accennato appena a proposito delle culture del tetano che la presenza dei leucociti può non essere indifferente a favorirle e si può sempre constatare che l'aggiunta d'un frammento di ganglio linfatico al sangue vi rende possibile lo sviluppo rigoglioso di tutti i germi, compreso il bacillo del tetano.

Quanto alle culture aerobiche in siero e in liquido ascitico mi rimane poco a dire, perchè i risultati furono nelle diverse riprove fatte sempre concordi, tolte poche eccezioni alle quali accennerò tra poco.

Il siero da me adoperato era di pecora ed era stato preventivamente riscaldato per 15 minuti a 55°, allo scopo di spogliarlo di un eventuale potere battericida. In altre prove, benchè non estese a tutta la serie dei germi anaerobici, il siero era di coniglio e non era stato sottoposto all'azione del calore. Il liquido ascitico proveniva da un infermo per cirrosi epatica e venne pure adoperato tale quale fu raccolto, senza alcun trattamento preventivo.

Tutte le culture rimasero sterili ad eccezione di quelle del *Clostridium carnis foetidum*, del *bac. d. Bradsot* e del *bac. carnis saprogenes*, dei quali si ottenne lo sviuppo, solo però nei tubi contenenti siero di sangue, mentre rimasero negativi anche per questi tre germi i tubi contenenti liquido ascitico. È bene ricordare a questo proposito che questi tre germi appunto nelle culture in brodo non si erano dimostrati strettamente anaerobii.

Anche per il siero e per il liquido ascitico però, nello stesso modo di quanto si è visto avvenire per il sangue a proposito delle culture col bacillo tetanico, si mostrò costantemente condizione sufficiente per ottenervi prontamente lo sviluppo rigoglioso di qualsiasi dei germi anaerobici l'addizione al substrato di un frammento di tessuto. Già dopo 24 ore di termostato la cultura era in pieno vigore; mi parve solo di notare per le culture in siero di pecora del bacillo tetanico una certa difficoltà di sviluppo, benchè questo però non sia mancato mai, ed una tendenza dei bacilli a tenersi uniti in piccoli ammassi: l'evoluzione del germe però avveniva completa fino alla formazione della spora.

V. CULTURE NEL LATTE — Non avendo potuto avere di questo liquido raccolto sterilmente onde provarne, come del sangue e del siero, le attitudini e servire nelle condizioni sue naturali come un substrato di cultura aerobica per i germi anaerobici, dovetti prima di adoperarlo sottoporlo alla sterilizzazione.

Feci pertanto per tutti i germi due serie di culture: nell'una il latte era stato sterilizzato nel vapore di acqua per 15 minuti ad

una temperatura non superiore a 106° – 108° C., nell'altra la temperatura di sterilizzazione era stata spinta fino a 120° – 125° . Perchè non sembri messa così a caso e senza plausibile ragione questa doppia prova, dirò per ora soltanto che ad essa mi indusse la considerazione della presenza di una notevole quantità di lattosio nel latte. Di più feci per ogni germe in entrambe le serie culture aerobiche ed anaerobiche e ciò perchè io quì dovevo usare di un mezzo nutritivo che era stato prima fortemente riscaldato.

Delle dodici specie di germi anaerobici, delle quali furono fatte culture nel latte, dieci dettero risultato positivo, fu inconstante lo sviluppo per il carbonchio sintomatico e per il *bac. putrificus*; si ebbe un risultato costantemente negativo per il bacillo del tetano e per il *bac. carnis*. Nelle culture positive non notai, relativamente alle modificazioni presentate dal liquido nel suo aspetto esterno, fatti che mi sembrassero caratteristici. In tutte le culture, dopo qualche giorno, si separava la caseina coagulata, rimanendo negli strati superiori il siero limpido. L'odore emanato dalle culture ricordava quello di alcuni formaggi putrefatti senza che presentasse una nota caratteristica per un determinato germe. Osservai in tutti i casi positivi lo sviluppo regolare del germe fino alla formazione della spora, ma lo sviluppo fu sempre più scarso assai di fronte a quello che si poteva ottenere in tubi di brodo al quale fosse stato aggiunto del tessuto fresco.

Notevole invece mi sembrò il fatto che per tutti quei germi, dei quali si ebbe sviluppo nelle culture anaerobiche, lo stesso risultato positivo si ottenne nei tubi lasciati a contatto dell'aria. In questo secondo caso lo sviluppo si palesava però alquanto più tardi che nel primo. Io avevo in altro luogo (Riforma medica 1905 - N. 6-7-8) ed a proposito di altri germi anaerobici asserito che anche nel latte, al pari che per altri liquidi naturali, lo sviluppo era eccezionale o difficilissimo. Così non sembra risultare per la serie dei germi sui quali ho ora sperimentato e credo che oltre ad altre possibili ragioni relative alla diversità di origine e forse di specie dei diversi germi, possa anche avervi influito il fatto che io per le prime ricerche usavo un latte che era stato

sterilizzato all'autoclave e che poi per lungo tempo era rimasto esposto dentro ai tubi di cultura all'aria e alla luce dell'ambiente, mentre in questa ultima serie di ricerche io usava un latte appena munto e da poco tempo sterilizzato. Comunque sia, il verificarsi dello sviluppo aerobico nel latte e tantopiù in un latte che aveva subìta l'azione di temperature anche molto elevate, può sembrare un pò in contraddizione con gli altri fatti sopra esposti. È appunto di questa apparente contraddizione che io credo debba cercarsi la ragione — come meglio sarà studiato in altro lavoro — nella presenza del lattosio entro il latte.

*
* *

Da quanto ho più sopra esposto chiaramente appare con quali mezzi semplicissimi si sia sempre potuto ottenere per la serie dei germi anaerobici di cui disponevo, lo sviluppo facile e sicuro in culture anche lasciate liberamente al contatto dell'ossigeno atmosferico. Ora mi sia lecito — per quanto, come ho già detto, io non abbia avuto per obbiettivo di addentrarmi nei particolari eventualmente caratteristici per ogni singola specie di questi germi — di manifestare una opinione che può nascere come naturale conseguenza della massa delle osservazioni fatte. Mi sembra cioè che anche per questa famiglia dei così detti anaerobici, nello stesso modo che per i comuni aerobi saprofiti, quando i soli criterî morfologici e culturali non possano essere coadiuvati da altri biologici e fisio-patologici, noi ci possiamo trovare di fronte a serie difficoltà e forse alla impossibilità di dare un fondamento sicuro alla differenziazione delle singole specie. Le osservazioni da me compiute in queste ricerche non mi autorizzano certo a poter nulla affermare in modo assoluto a questo riguardo, ma se dovessi stare ai criterî suggeriti dall'esame microscopico e culturale — e per molti di questi germi pochi di più ne possiamo avere — io non esiterei a ritenere probabile che più di una delle specie credute distinte in altro non differiscano tra loro che per la provenienza diversa e per il diverso Autore che le ha per primo descritte. Ed a dare sempre maggior corpo a questa possibilità vi contribuisce anche il fatto che non avendo

finora a disposizione dei mezzi adatti e sicuri per l'isolamento di tutti gli anaerobi si trae generalmente partito dalla resistenza delle spore al riscaldamento, mentre è probabile che una serie forse estesissima di altri germi di questa stessa famiglia, non sporificanti si sottragga così al nostro studio.

*
* *

In un' ultima serie di ricerche ebbi per scopo di vedere se colla somministrazione di tessuto allo stato naturale si potesse ancora rilevare facilmente la presenza di spore vitabili di germi anaerobici, le quali da un tempo più o meno lungo fossero rimaste inerti in liquidi vari, ma impropri al loro sviluppo aerobico. A questo fine ho praticate seminagioni di tutte le varie specie di anaerobi che possedevo in tubi contenenti brodo, siero, sangue e liquido ascitico. I tubi così seminati erano poi tenuti per 3-4 giorni nel termostato a 37° - 38° per constatare che in nessuno di essi si avesse sviluppo aerobico di germi, ed in seguito venivano abbandonati alla luce dell' ambiente per un tempo vario, che non superò mai i tre mesi.

Siccome, giusta quanto si è precedentemente visto, nel sangue anche i germi anaerobici, ad eccezione del bacillo del tetano, si erano dimostrati capaci di un certo sviluppo anche in presenza dell' ossigeno, per quanto questo sviluppo fosse sempre molto scarso e lento, così per questo liquido limitai le osservazioni al solo bacillo tetanico. Per la stessa ragione i tre germi (*Clostridium carnis foetidum*, bac. d. Bradrot e bac. carnis saprogenes) i quali dettero culture positive aerobiche anche se coltivati semplicemente nel brodo e nel siero, in questa serie di osservazioni vennero esaminati soltanto nel liquido ascitico, nel quale le antecedenti culture aerobiche erano rimaste sterili.

Trascorso il tempo voluto (da uno a tre mesi) introducevo in questi tubi un pezzetto di fegato o di altro organo parenchimale asetticamente prelevato da una cavia e li riponevo nel termostato. Siccome in qualche tubo contenente del sangue questo liquido si era quasi interamente prosciugato, aggiungevo in questi casi alla cultura 2-3 cmc di brodo sterile.

Anche per queste osservazioni i risultati si compendiano in brevi parole, in quanto essi riuscissero per tutti i germi positivi, e le culture esaminate già solo dopo 24 ore di incubazione nel termostato mostravano uno sviluppo rigoglioso. Si verificò tuttavia per alcuni germi qualche risultato negativo ora nell'uno, ora nell'altro dei liquidi di cultura adoperati, senza una norma fissa. Questi risultati negativi furono però molto rari ed a lato delle culture che non avevano dato segno di sviluppo se ne potevano vedere sempre per lo stesso germe altre riuscite positive. Di tutte le culture fatte, che furono due per ogni liquido e per ogni germe, fu negativa una del *bac. entereditis sporogenes* in liquido ascitico, una del *bail.us carnis* pure in liquido ascitico, ed una in brodo del carbonchio sintomatico. Per il tetano riuscirono tutte positive le culture nel sangue, nel siero, nel liquido ascitico; delle due culture in brodo invece, a tre mesi dall'innesto, una riuscì positiva e l'altra negativa.

Non avendo io fatto ricerche sistematiche per appurare la durata massima della vitabilità delle spore dei varii germi nelle sopradette condizioni non posso su ciò pronunziarmi. Importa per me invece rilevare come, facendo trapianti in brodi, che poi si chiudevano anaerobicamente, da tutti questi tubi prima di aggiungerli il frammento di tessuto, non ottenevo sviluppo alcuno. Così pure sottraendo l'ossigeno ad alcuni di questi tubi e ponendoli poi direttamente in termostato, essi in generale rimanevano sterili. Dettero invece sviluppo con relativa costanza dei tubi contenenti brodo glucosato, che dopo essere stati seminati erano rimasti esposti all'aria e alla luce dell'ambiente per oltre un mese.

Questi dati ottenuti con ricerche, che per molti lati riconosco io stesso incomplete, mi pare possano però già stare a dirci che se l'assenza dell'ossigeno è una condizione indispensabile allo sviluppo dei germi anaerobici nei comuni substrati nutritizi a base di brodo-peptone, tuttavia la cultura anaerobica non può considerarsi come il vero mezzo naturale e di elezione per detti germi. Nelle culture anaerobiche infatti, quali noi generalmente praticiamo servendoci di substrati preparati dal brodo, per le condizioni particolari in cui vi si trovano relativamente ai bisogni dei germi anaerobici le sostanze (o almeno una parte necessaria di

esse), che hanno subìta la azione del calore e che devono servire alla nutrizione dei germi stessi, questi presumibilmente dovranno spiegare un certo potere di adattamento, il quale può — specialmente quando si tratta di spore che abbiano lungamente soggiornato inerti nell' ambiente esterno — essersi affievolito, senza che perciò debba considerarsi spenta la loro vitabilità.

E riassumendo brevemente i risultati di queste ricerche, concludo :

1° La cultura aerobica provata sopra 13 specie di germi anaerobici noti è riuscita costantemente e facilmente per 12 di essi. Il solo germe (*bac. fusiformis serof.*), la cultura aerobica del quale non è riuscita, ha dato parimente sempre risultati negativi anche nelle culture anaerobiche, per cui è logica supposizione che la sua vitalità fosse già spenta nella cultura originale.

In seguito a questi risultati mi sembra fondato il ritenere che per tutti i germi anaerobici (per quelli almeno che sono stati isolati dall' animale o da sostanze animali in decomposizione e che sono tutti o quasi tutti i germi anaerobici conosciuti) sia possibile lo sviluppo aerobico quando si modifichi il substrato artificiale nutritivo, aggiungendovi del tessuto organico animale allo stato naturale. In queste condizioni si ottenne sempre e per tutti i germi esaminati lo sviluppo pronto e rigoglioso, mentre questo può spesso fallire nelle culture anaerobiche in brodo od in substrati con esso preparati. Il tessuto organico animale morto ed allo stato naturale si mostrò per sè solo un substrato acconcio e sufficiente alla vita ed allo sviluppo di tutti i germi esaminati.

2° Tutti questi germi, sviluppandosi sui tessuti animali allo stato naturale, vi inducono delle fermentazioni putride.

3° Nessun carattere culturale apparente in queste condizioni si è mostrato distintivo per una determinata specie.

4° Nel brodo preparato nell' autoclave ad una temperatura non molto elevata (107°-108°) ed a condizione che vi sia nella cultura una parte del precipitato albuminoso, tutti questi germi possono ancora svilupparsi aerobicamente. In generale il precipitato albuminoso viene disciolto ed in questi casi la cultura si sviluppa rigogliosamente. Nelle culture invece del *bacillo del te-*

tano e del *bac. carnis* si osservò soltanto modificarsi il colore del precipitato, che riacquistava un colorito roseo di carne, mentre lo sviluppo del germe rimaneva sempre povero e la sporificazione o mancante o deficiente. Il mutamento di colore, che del resto è fenomeno generale per tutte le culture e si verifica anche per quei germi che portano alla dissoluzione del precipitato, è presumibilmente da ritenersi legato a fenomeni di riduzione subiti dalla sostanza colorante della carne.

5° La cultura aerobica non riuscì nel siero e nel liquido ascitico per nessuno dei germi esaminati, ad eccezione che per tre specie (*Clostridium carnis foetidum*, *bac. d. Bradso* e *bac. carnis saprogenes*), le quali però non si mostrarono strettamente anaerobiche neppure nelle culture in brodo. Nel sangue invece, come viene estratto dall'organismo, fu possibile un lento e molto scarso sviluppo ad eccezione che per il bacillo del tetano.

In ognuno dei sopradetti liquidi si può ottenere per tutti i germi uno sviluppo rigoglioso alla semplice condizione di aggiungervi un frammento di tessuto organico animale allo stato naturale.

6° Nel latte, anche sterilizzato all'autoclave, riuscì positiva la cultura aerobica per la maggior parte dei germi anaerobici; lo sviluppo vi fu però in ogni caso sempre poco rigoglioso. Dettero risultato costantemente negativo il *bac. del tetano* ed il *bac. carnis*.

7° Le spore di tutti i germi presi in esame si mantennero vitabili per un tempo molto lungo, per quanto non esattamente determinato (il limite massimo della osservazione si spinse solo fino a tre mesi) tanto nel brodo che nel siero e nel sangue, anche se lasciate esposte all'aria ed alla luce dell'ambiente. La loro presenza e vitabilità fu prontamente rilevabile aggiungendo al mezzo di cultura un frammento di tessuto animale fresco e dopo un giorno solo di incubazione in termostato, anche quando la semplice condizione di assoluta anaerobiosi non si mostrava sufficiente a determinarne lo sviluppo.

Siena - Marzo 1905.



